

## IMMOBILIZED ENZYME MEMBRANE AND PRODUCTION THEREOF

Publication number: JP62083885

Publication date: 1987-04-17

Inventor: HIBINO TAKESHI; OKADA TAKESHI; NAKAO  
KAZURO; SAHASHI HIROKO

Applicant: NITTO ELECTRIC IND CO




Classification:

- International: B01D67/00; B01D69/14; C07K17/08; C12N11/02;  
C12N11/06; C12N11/08; B01D67/00; B01D69/00;  
C07K17/00; C12N11/00; (IPC1-7): C07K17/08;  
C12N11/06- European: B01D67/00R14; B01D69/14B; C12N11/02; C12N11/06;  
C12N11/08

Application number: JP19850225435 19851008

Priority number(s): JP19850225435 19851008

Also published as:

 EP0223389 (A1)  
 US4983494 (A1)  
 EP0223389 (B1)

Report a data error here

## Abstract of JP62083885

**PURPOSE:**An immobilized enzyme membrane, obtained by covalently bonding an enzyme to a porous layer of an anisotropic ultrafiltration membrane through  $\geq 2$  functional groups of a water-soluble high polymer held in a crosslinked state, capable of keeping the enzyme in a highly active state and usable for a long period without elimination of the enzyme. **CONSTITUTION:**An anisotropic ultrafiltration membrane consisting of a dense layer having 1,000-1,000,000 fractionation molecular weight and a porous layer, supporting the above-mentioned layer and having several  $\mu\text{m}$ -100 $\mu\text{m}$  pore diameter is prepared, impregnated and washed with a solution of a water-soluble high polymer, e.g. polyethylenimine, having  $\geq 2$  functional groups in  $\leq 1\text{wt}\%$  concentration from the porous layer side under 0.1-1.0 $\text{kg}/\text{cm}^2$  pressure. A crosslinking agent solution, e.g. glyoxal, is then permeated from the porous layer side within the above-mentioned pressurizing condition range to crosslink the water-soluble high polymer. The uncrosslinked water-soluble high polymer is further removed by back washing which is normal washing treatment. An enzymic solution is then permeated from the porous layer side to covalently bond the enzyme to the porous layer through the functional groups of the above-mentioned water-soluble high polymer and afford the aimed immobilized enzyme membrane.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開  
⑫ 公開特許公報(A) 昭62-83885

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和62年(1987)4月17日  
C 12 N 11/06 7823-4B  
// C 07 K 17/06 8318-4H 審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 酵素固定膜及びその製造方法

⑯ 特 願 昭60-225435

⑰ 出 願 昭60(1985)10月8日

⑱ 発 明 者	日 比 野 健	茨木市下穂積1丁目1番2号	日東電気工業株式会社内
⑱ 発 明 者	岡 田 猛	茨木市下穂積1丁目1番2号	日東電気工業株式会社内
⑱ 発 明 者	中 尾 和 朗	茨木市下穂積1丁目1番2号	日東電気工業株式会社内
⑱ 発 明 者	佐 橋 裕 子	茨木市下穂積1丁目1番2号	日東電気工業株式会社内
⑲ 出 願 人	日東電気工業株式会社	茨木市下穂積1丁目1番2号	

明 細 書

1. 発明の名称

酵素固定膜及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 異方性限外濾過膜の多孔質層に、少なくとも2個の官能基を有する水溶性高分子が架橋状態にて保持されており、且つ該官能基を介して酵素が共有結合されていることを特徴とする酵素固定膜。

(2) 異方性限外濾過膜がポリスルホン膜である特許請求の範囲第1項記載の酵素固定膜。

(3) 水溶性高分子がポリエチレンジアミンまたはリアリールアミンである特許請求の範囲第1項記載の酵素固定膜。

(4) 水溶性高分子がジアルデヒドまたはジイソシアネートにて架橋されている特許請求の範囲第1項記載の酵素固定膜。

(5) 異方性限外濾過膜の多孔質層側から少なくとも2個の官能基を有する水溶性高分子溶液を0.1～1.0 kg/cm<sup>2</sup>の加圧条件下にて含浸、洗浄した後、架橋剤溶液を前記加圧条件範囲内にて多孔質層側

から透過させて前記水溶性高分子を架橋せしめ、さらに未架橋の水溶性高分子を緻密層側からの逆流洗浄によって除去し、次いで酵素溶液を多孔質層側から前記加圧条件以下で透過させて前記水溶性高分子の官能基を介して酵素を共有結合させることを特徴とする酵素固定膜の製造方法。

(6) 異方性限外濾過膜がポリスルホン膜である特許請求の範囲第5項記載の酵素固定膜の製造方法。

(7) 水溶性高分子がポリエチレンジアミンまたはリアリールアミンである特許請求の範囲第5項記載の酵素固定膜の製造方法。

(8) 水溶性高分子がジアルデヒドまたはジイソシアネートにて架橋されている特許請求の範囲第5項記載の酵素固定膜の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〈産業上の利用分野〉

本発明は酵素固定膜及びその製造方法に関するものである。

〈従来の技術〉

近年、酵素反応を利用した工業的規模での実用

## 特開昭62-83885(2)

は医薬品や食品工業の分野で盛んに行なわれているが、酵素自体の価格が高価なことや、溶液状態にて使用した場合に反応後における生成物と酵素の分離や回収が困難であることなどの問題点から、担持体に酵素を固定する、所謂固定化酵素の手法が種々検討されている。

反応生成物と酵素の分離を酵素反応と同時に処理できる方法として限外濾過膜の如き膜を利用した方法が研究されており、精密分離精製の前処理として分子分画による粗分離処理が極めて容易になるものとして注目されている。その一つとして、酵素を固定したメンブレンリアクターが提案され、酵素を異方性限外濾過膜の多孔質部に閉じ込めて被覆を施す方法(特開昭59-25686号公報)や、多孔質部に酵素をゲルと共に封入包括する方法(特公昭57-41238号公報)などが開示されているが、いずれも酵素を安定に保持することができず、安定に保持できる膜が開発されていないのが現状である。

〈発明が解決しようとする問題点〉

ことを特徴とするものである。

さらに、かかる酵素固定膜を得る好適な製造方法は、異方性限外濾過膜の多孔質部側から少なくとも2個の官能基を有する水溶性高分子溶液を0.1~1.0 g/cm<sup>2</sup>の加圧条件下にて含浸、洗浄した後、架橋剤溶液を前記加圧条件範囲内にて多孔質部側から透過させて前記水溶性高分子を架橋せしめ、さらに未架橋の水溶性高分子を微密層側からの逆洗浄によって除去し、次いで酵素溶液を多孔質部側から前記加圧条件以下で透過させて水溶性高分子の官能基を介して酵素を共有結合させることを特徴とするものである。

本発明において用いられる異方性限外濾過膜は、分画分子量が1000~1,000,000の性能を有する微密層と、該層を担持する孔径が数 $\mu$ m~100 $\mu$ mの多孔質層とからなるものであり、その形状は平板状、管状、中空糸状など任意に選択することができる。好ましくは有効膜面積を大きくし、固定化された酵素と基質との接触面積を大きくするために中空糸状膜とすることが望ましい。

従って、本発明の第1の目的は、酵素の固定化法が多く、且つ高活性に維持出来て基質との反応生成物、特に高分子基質との反応生成物である低分子生成物の分離機能に優れた酵素固定膜を提供することにある。

本発明の第2の目的は、上記酵素固定膜を効率よく製造するための方法を提供することにある。  
〈問題点を解決するための手段〉

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を行った結果、異方性限外濾過膜の多孔質部に、加圧条件下にて特定の水溶性高分子を透過、含浸させ、架橋剤によって架橋せしめた後、酵素の溶液を透過、含浸させて固定化された酵素が自由能に優れ、酵素活性が非常に高い酵素固定膜が得られることを見出し、本発明に至ったものである。

即ち、本発明の酵素固定膜は、異方性限外濾過膜の多孔質部に、少なくとも2個の官能基を有する水溶性高分子が架橋状態にて保持されており、且つ該官能基を介して酵素が共有結合されている。

上記限外濾過膜を製造するに際して用いる材料としては、例えばポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ポリイミド、酢酸セルロース、ポリアクリルニトリルなどが挙げられ、これらの材料は後述する水溶性高分子や酵素と反応するような官能基を特に有する必要はなく、異方性限外濾過膜として製膜できるものであれば特に制限はない。これらの膜材料のうち、食品や医薬品の製造工程において要求される厳格な分画分子量を満足するものとして、ポリスルホン、ポリアミド、ポリイミドを用いることが好ましく、耐熱性や機械的強度の面で、特にポリスルホンが好適に使用できる。

上記異方性限外濾過膜は既知の方法で製造することができる。その一例としては上記膜材料を水と混和しうる極性有機溶剤、例えばジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、フェノール、クレゾール、エチレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、セルソルブ、グリセリン、メタノー

## 特開昭62-83865(3)

ル、エタノール、プロパノール、ブタノール、アセトン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのうち一種以上に溶解せしめたのち、主として水からなる凝固液と接触させることによって接触界面に緻密層を有する各種形状の異方性限外透過膜とすることができるが、緻密層と多孔質層を有する異方性限外透過膜であれば如何なる方法、形状のものであっても本発明の技術を採用することができる。

本発明の鮮果固定膜は上記で得られた異方性限外透過膜の多孔質層に、少なくとも2個の官能基を有する水溶性高分子物質を加圧条件下にて含浸し、架橋剤によって架橋せしめるが、このような水溶性高分子としては、例えばポリエチレンジアミン、ポリプロピレンジアミン、ポリブタレンジアミンの如きポリアルキレンジアミン、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールの如きポリアルキレングリコール、ポリリジン、ポリアルギニンの如きポリアミノ酸、ポリアリーールアミンなどが挙げられ、通常、重量平均分子数が約1000～

200000、官能基数が数十～数百のものが好ましく、使用する鮮果の種類や膜材料の種類、膜の形状に応じて適宜選択することが出来る。これらの水溶性高分子のうち、ポリエチレンジアミンやポリアリーールアミンは官能基数の調節が容易で、反応性も高いので好適に用いることができる。

上記水溶性高分子の溶液を異方性限外透過膜の多孔質層に含浸するにあたり、凝固液の溶質濃度は1重量%以下、好ましくは0.05～0.25重量%の範囲に設定する。溶質濃度が1重量%を超えた場合は溶液粘度が高くなり、含浸した水溶性高分子が膜孔を閉塞し、溶質溶液の透過水量が低下して限外透過性能が低下することがある。

また、水溶性高分子の溶液を含浸する場合の加圧条件としては限外透過膜の多孔質層側と緻密層の圧力差が0.1～1 $\mu$ /cm<sup>2</sup>、さらに0.1～0.5 $\mu$ /cm<sup>2</sup>の範囲が好ましく、高加圧下での含浸では多孔質層内部、特に緻密層側に水溶性高分子の圧密化が生じ、膜孔を閉塞する恐れがある。また加圧条件が低くすぎると水溶性高分子の多孔質層への含浸

に時間がかかったり、多孔質層全体への均一な含浸を行ない難く、膜層部のみへの含浸となり鮮果の結合量の低下を招く恐れがある。

上記の如く含浸を行なった水溶性高分子は異方性限外透過膜の多孔質層に保持されるが、数回の膜洗浄操作によって不純物質や強度に低分子量の水溶性高分子が除去される。しかるのち架橋剤溶液を前記水溶性高分子溶液含浸時の加圧条件範囲内、通常は前記と同条件下にて多孔質層側から透過せしめて前記水溶性高分子を架橋せしめる。このような架橋手段を施すことによって水溶性高分子は三次元化して不溶化し、分子のかさばりや立体障害が大きくなるので、異方性限外透過膜の膜自体に結合せずとも多孔質層の孔内に保持することができる。後の逆洗浄によっても流出しないものとなる。

このような架橋剤としては、グリジオキサール、グルタルアルデヒド、アジピンアルデヒド、マロンジアルデヒド、ジアルデヒド酸の如きジアルデヒド類、ヘキサメチレンジイソシアネート、ト

ルエンジイソシアネートの如きジイソシアネート類、ヘキサメチレンジイソチオシアネートの如きジイソチオシアネート類などが挙げられ、水溶性高分子にポリアミノ酸を使用した場合には水溶性カルボジイミドなどの縮合試薬を用いることもできる。これらのうち、特にジアルデヒド類やジイソシアネート類は水溶液中で比較的安定で反応性も高いために好適に用いることができる。

上記架橋剤は溶液状態で使用するが、水溶性高分子中の官能基量と架橋剤中の官能基量とのモル濃度比を2～50、好ましくは8～20とすることによって、のちに鮮果と結合する官能基量を十分に残存させることができる。また、用いた架橋剤の官能基を一部利用してのちに鮮果を結合させることもできるが、この場合は上記量の1.5～2.0倍量の架橋剤を用いることが望ましい。

次に異方性限外透過膜の多孔質層に水溶性高分子を含浸、架橋したのち、緻密層側から通常の洗浄処理である逆洗浄によって多孔質層に残存する未架橋の水溶性高分子を除去する。しかるのち鮮

特開昭62-83885(4)

基溶液を多孔質膜より透過させて前記水溶性高分子の官能基を介して共有結合させる。

前記水溶性高分子はその分子末端や側鎖にアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基などの官能基を有しているため、既知の手法を用いて酵素が有する官能基と反応、または前記架橋剤やカップリング剤によって間接的に共有結合させる。さらに、固定化された酵素の可動性を大きくし、酵素反応を高めるためにスパーサーを介在させることもできる。

本発明に用いられる酵素としては特に限定されるものではないが、本発明の酵素固定膜を用いて限外濾過膜としての特性を充分に発現するためには多糖類や蛋白質の加水分解に用いることが有用であり、例えばα-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ムラミダーゼの如き多糖類加水分解酵素、パepsin、ペプシン、トリプシン、ヤモトリプシン、プロメライン、プロテアーゼの如き蛋白質加水分解酵素などが高分子基質から低分子物質を生成するものとして挙げ

られる。

上記酵素を含む溶液を透過させるに際しての加圧条件は、前記水溶性高分子や架橋剤を含浸する時の条件、即ち0.1~1 kg/cm<sup>2</sup>の範囲に設定し、且つ前記含浸時の加圧条件以下とする。加圧圧力が大きすぎると、既に保持されている水溶性高分子が圧密化された層を新たに形成するために、基質溶液を透過させて酵素反応をさせる場合に、基質の透過移動の障害となり、固定化した酵素を反応に有効活用することができなくなる。

〈発明の効果〉

以上のように本発明の酵素固定膜は、無活性限外濾過膜の多孔質膜に、架橋された水溶性高分子が保持され、該高分子の官能基を介して酵素が共有結合によって固定化されているため、酵素は高活性を有するように自由度が確保されており、且つ酵素反応を行なっても長時間に亘って酵素の離脱がなく使用できうるものである。また本発明の製造方法によれば、加圧条件下にて含浸、透過させるので短時間での製造ができ、基質溶液の透過

経路である孔内に酵素を保持しているため接触機会が随分多くなり、基質溶液の大量処理及び分箱を短時間で達成できるものである。

〈実施例〉

以下に本発明の実施例を示し、さらに詳細に説明するが、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲で種々の応用が可能である。

実施例1

ポリスルホン製限外濾過用中空糸状膜（日本電工製、NTU-3050）の小型モジュール（2 $\frac{1}{2}$ ×20 cm、200本入、横面積約800 cm<sup>2</sup>）の多孔質膜から0.1 g重量の乾燥のポリエチレンイミン水溶液（重塩平均分子量70,000、1分子当りのアミノ基数約400）を0.3 kg/cm<sup>2</sup>の加圧下にて約30分透過させた。

さらに大量の水を用い同圧下にて洗浄したのち、モジュール全体を40℃に維持しながら架橋剤として0.05 g重量のグルタルアルデヒド溶液（りん酸緩衝液pH 7.0）を同加圧下で透過し、多孔質膜に保持されているポリエチレンイミンを架橋し

た。

室温下にて逆洗浄を行ない多孔質膜に保持されないポリエチレンイミンを除去し、次に40℃にて多孔質膜側から2.5 g重量のグルタルアルデヒド溶液（りん酸緩衝液pH 7.0）を0.1 kg/cm<sup>2</sup>の加圧条件にて透過し、ポリエチレンイミンのアミノ基を活性化した。同加圧条件にて洗浄したのち2.5 g/cm<sup>2</sup>のα-アミラーゼ溶液（三共製、コクラゼ、酢酸緩衝液pH 6.0）を前記加圧下にて透過し共有結合によって固定化を行ない、本発明の酵素固定膜を得た。

比較例1

架橋剤としてのグルタルアルデヒド溶液を透過せず、ポリエチレンイミンの架橋処理を行なわなかった以外は実施例1と同様の操作を行ない酵素固定膜を得た。

実施例1及び比較例1にて得られた酵素固定膜に1 g重量の可溶性淀粉溶液（酢酸緩衝液pH 6.0）を0.5 kg/cm<sup>2</sup>の加圧下で供給し、一定期間毎に膜側からの逆洗浄を行ないながら40℃にて酵素

特開昭62-83885(5)

反応を続け、透過液中の還元糖の量を測定した。実施例1の酵素固定膜を用いた結果を第1図に示し、比較例1の場合を第2図に示した。

実施例1の酵素固定膜を用いた場合は1回目の逆洗浄で活性の低下が見られるが、未結合の酵素が洗浄によって流出した結果であり、以後活性の低下はほとんど見られず、安定に酵素が固定されていることを示唆している。

一方、比較例1の場合は、ポリエチレンイミンが架橋処理されていないので逆洗浄によって酵素の大半が流出して活性の大幅低下が見られた。

#### 実施例2

シート状ポリスルホン製限外濾過膜(日東電気工業、NTU-3150)を直径43mmの円型に打抜き、限外濾過用の透過セルに固定した。

次に該膜の多孔質層側から0.1重量%のポリアリールアミン水溶液(重量平均分子量10,000、1分子当りのアミノ基数約1750)を0.2 MPaの加圧下にて約30分間透過させた。

さらに大量の水を用い、同圧下にて洗浄したの

ち、架橋剤として0.1重量%のヘキサメチレンジイソシアネート水溶液を同加圧下にて透過し、多孔質層に保持されているポリアリールアミンを架橋した。

次に逆洗浄によって水洗を充分に行ない、多孔質層に保持されないポリアリールアミンを除去したのち、室温にて多孔質層側から2.5重量%のグルタルアルデヒド溶液(りん酸緩衝液pH7.0)を0.1 MPaの加圧下にて透過させ、ポリアリールアミンの官能基を活性化させた。同加圧条件下にて洗浄したのち3 MPaのプロテアーゼ(三共製、コクラゼ・SS)のりん酸緩衝液(pH7.5)溶液を0.1 MPaの加圧下、4℃にて透過し、共有結合によって固定化を行ない、本発明の酵素固定膜を得た。

得られた酵素固定膜をりん酸緩衝液(pH7.5)にて充分に逆洗浄したのち、1重量%のカゼイン溶液(りん酸緩衝液、pH7.5)を0.3 MPaの加圧下にて連続的に供給して酵素反応を行ない、透過液中の蛋白質分解物をケルダール法、トリクロロ

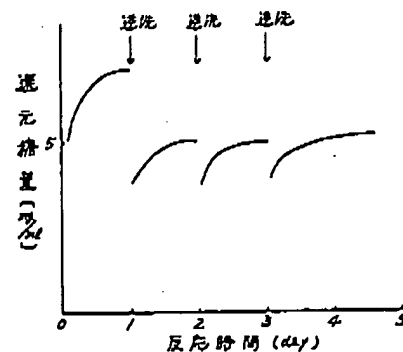
酢酸沈澱により測定した。透過液はトリクロロ酢酸で沈澱を生じず、該液中の遊離糖から算出して0.8重量%の遊離の低分子ペプチドが連続して10時間透過していることが判明した。

#### 4.図面の簡単な説明

第1図は実施例1にて得られた酵素固定膜の活性を測定した結果を示し、第2図は比較例1にて得られた酵素固定膜の活性を測定した結果である。

特許出願人  
日東電気工業株式会社  
代表者 齋 居 五 朗

第1図



第2図

